

機関番号：12201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780141

研究課題名 (和文) 北東アジアにおける寒温帯性マツ属樹種の遺伝的多様性と分布変遷

研究課題名 (英文) Genetic diversity and population history of cold temperate pine species in north-east Asia

## 研究代表者

逢沢 峰昭 (AIZAWA MINEAKI)

宇都宮大学・農学部・助教

研究者番号：70436294

## 研究成果の概要 (和文)：

北東アジアの寒温帯林に分布するマツ科チョウセンゴヨウの分布域が、数万年から数百万年という時間スケールの中でどのように変化してきたのかを明らかにするため、ミトコンドリア DNA (mtDNA) と葉緑体 DNA を用いて遺伝解析を行った。現在大陸部ではチョウセンゴヨウは広く分布しているにもかかわらず、mtDNA の遺伝的多様性を失っていた。一方、分布量の極めて少ない日本において遺伝的多様性が高かった。これは大陸部において過去に分布域の縮小が生じ、遺伝的変異の消失が起きたのに対して、日本では更新世を通して大きな集団が維持されてきたためと考えられた。

## 研究成果の概要 (英文)：

This study aimed to delineate the population history during the Quaternary of cold temperate pine, Korean pine (*Pinus koraiensis*), in north-east Asia. Range-wide genetic variation was assessed using mitochondrial DNA (mtDNA) and chloroplast DNA across the entire distribution range of the species. Genetic diversity of mtDNA haplotypes showed a complete loss of the diversity across the continental populations ( $H_T$ , total gene diversity, =0) exhibiting a single haplotype in spite of the extensive species natural range with large-sized populations. In contrast, a higher level of genetic diversity was observed in Japanese populations ( $H_T=0.502$ ) harbouring three mtDNA haplotypes despite the restricted natural range with quite small populations. The loss of genetic diversity and fixation of the single haplotype in the continental populations could result from the contraction into a single refugium in the past; the higher level of genetic diversity of Japanese populations suggested that Korean pine retained large-sized populations in Japan during the Pleistocene.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：遺伝的多様性, 第四紀, チョウセンゴヨウ, 分布変遷, 北東アジア, ミトコンドリア DNA, 葉緑体 DNA

## 1. 研究開始当初の背景

現在から約 260 万年前に始まった第四紀は気候変動の大きな時代である。この気候変動は、現在の植物の分布に極めて大きな影響を及ぼしたと考えられている。近年、分子系統地理学的研究によって、姉妹種間や同一種内の集団・個体間の遺伝的な類縁関係が調べられ、植物がアジア大陸から陸橋を経由して日本列島に移住してきたという植物地理学的シナリオや、大陸内あるいは国内での分布変遷史に対して、より実証的な推論を与えることが可能となってきた。この際、日本と大陸に分布する植生帯の主要構成樹種を研究対象とすることによって、植生帯の分布変遷のシナリオを再現することが可能になると期待される。

マツ科のチョウセンゴヨウ (*Pinus koraiensis*) は、ロシア沿海州、中国東北部、朝鮮半島、および日本の寒温帯・亜高山帯林に生育し、大陸部ではその森林の主要構成樹種となっている。また、日本において第四紀を通して化石情報が多いことから、過去の分布変遷を調べる上で適した樹種であると考えられる。そこで筆者は、チョウセンゴヨウを対象として、マツ科では母性遺伝するミトコンドリア DNA (mtDNA) の 4 つの遺伝子領域について、ロシア、中国東北部、韓国、および日本の各集団内の複数個体に対して、ダイレクトシーケンス法を用いて塩基配列を決定し、その分布変遷について研究を進めてきた (平成 19~20 年度科学研究費補助金若手研究 (B), 課題番号: 19780111)。しかし、mtDNA の解析個体数が少なかったことから、系統解析に加えて mtDNA の遺伝的多様性の評価を行う上では、全体的にサンプル数を増やして網羅的な解析が必要と考えられた。また、全体的に mtDNA の遺伝的変異性が低かったことから、マツ科では父性遺伝する葉緑体 DNA (cpDNA) についても解析を行い、遺伝情報を増やす必要があると考えられた。さらに、とりわけ現在の植物の地理的分布に大きな影響を与えたと考えられている最終氷期 (2~3 万年前) 以降の温暖・湿潤化といった気候変動にともなう、集団の縮小・拡大、南下・北上といった数万年スケールの比較的新しい歴史は、多型性が極めて高く、集団内や集団間の違いを容易に検出できる核 DNA のマイクロサテライト (以下、SSR) 領域の解析が有効であることが知られている (例えば、Heuertz et al. 2004; Tsumura 2006)。したがって、使用可能な核 DNA の SSR マーカーのスクリーニングを行い、解析可能なマーカーを探索する必要があると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、筆者の前回の研究 (課題番

号: 19780111) で変異が検出された mtDNA の 2 つの領域と、新たな cpDNA の 2 つの領域に対して、全集団・全個体の網羅的解析を行い、その遺伝的多様性の分布パターンを基に、第四紀におけるチョウセンゴヨウの分布変遷史を推論することを目的とした。さらに、核 DNA の SSR マーカーの探索・予備的解析を行うことを併せて目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝解析試料と DNA 抽出

遺伝解析試料として、本種の分布域を広く網羅するように、日本国内については 5 集団 (各集団 3~24 個体) で採取した針葉を、国外については Kim et al. (2005) で使用したロシア 3 集団、中国 5 集団、韓国 3 集団 (各集団 5~10 個体) の種子を用いた (表-1)。これらの試料から DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて全 DNA を抽出した。なお、mtDNA および cpDNA 解析用の DNA は、各個体 1 粒の種子の胚乳から抽出した。核 DNA の SSR 解析用には、各個体 1 粒の種子の胚から抽出した DNA を用いた。

### (2) オルガネラ DNA 解析

mtDNA については、前回の研究で多型が検出された 2 つの領域について解析した。その際に、2 つの変異サイトについては、制限酵素 *AvaII* および *MboII* によって、残りの 1 つの変異サイトについては片鎖一方向のみの one-pass シーケンスによって塩基配列を決定した。これによって全個体を網羅的に解析した。cpDNA については、2 つの領域について、全個体の塩基配列をダイレクトシーケンスによって決定した。

これらの情報を基に DNA 型 (ハプロタイプ) を決定し、NETWORK ver.4.5.1.6 (Bandelt et al. 1999) を用いて、ハプロタイプ間の系統的關係を推定した。系統推定の際には、塩基置換および挿入・欠失の重み付けは平等とし、Median-joining 法を用いた。さらに、ARLEQUIN ver.3.5.1.2 (Excoffier et al. 2005) を用いて、集団あたりのハプロタイプの遺伝子多様度 (Nei 1987) の推定と、遺伝的分散の所在を評価する AMOVA (Analysis of molecular variance) を行った。

### (3) 核 DNA の SSR マーカーの選抜

解析に用いる核 DNA の SSR マーカーは、同じマツ属樹種である *Pinus strobus* で作出された 23 遺伝子座 (Echt et al. 1996; Echt et al. 1999), *P. taeda* で開発された 25 遺伝子座 (Elsik et al. 2000; Kutil and Williams 2001), 合計 48 座を用いた。16 集団の各集団から 2 個体、合計 32 個体を選び、全 SSR マーカーに対してそれぞれ PCR 増幅を行い、単一の PCR 産物の得られるマーカーを選抜した。

表-1 チョウセンゴヨウの遺伝解析用試料の採取地とミトコンドリア DNA (mtDNA) と葉緑体 DNA (cpDNA) の遺伝子多様度( $H$ )

Population	Code	Country	Lat. (N)	Long. (E)	mtDNA cpDNA	
					N	H
Nizhne-Tambovsk, KH	NIZ	Russia	-	-	10	0 0.200
Komsomolsk-on-Amur, KH	KOM	Russia	50°43'	137°13'	10	0 0
Kur-Urmi, KH	KUR	Russia	49°11'	133°29'	10	0 0.533
Liangshui, HE	LIA	China	47°11'	128°54'	10	0 0.356
Xiaobeihu, HE	XIA	China	44°02'	128°49'	9	0 0
Wangqing, JL	WAN	China	43°20'	129°44'	9	0 0
Lushuihe, JL	LUS	China	42°32'	127°47'	8	0 0
Caohekou, LA	CAO	China	40°52'	123°53'	6	0 0
Mt. Seorak, KA	SEO	S. Korea	38°09'	128°29'	9	0 0
Mt. Taebaek, KY	TAE	S. Korea	37°05'	128°56'	5	0 0
Mt. Palgong, KY	PAL	S. Korea	36°00'	128°42'	10	0 0.200
Minami-Aizu, CH	MIN	Japan	36°59'	139°33'	3	0 0
Mt. Kusatsu-shirane, CH	KUS	Japan	36°38'	138°32'	9	0 0
Mt. Nishi-dake, CH	NIS	Japan	35°57'	138°19'	24	0.290 0.083
Mt. Ontake, CH	ONT	Japan	35°55'	137°32'	15	0.533 0
Mt. Higashi-Akaishi, SH	HIG	Japan	33°52'	133°23'	5	0 0

KH, Khabarovskiy; HE, Heilongjiang; JL, Jilin; LA, Liaoning; KA, Kangwon-do; KY, Kyongsangbuk-do; CH, central Honshu; SH, Shikoku; N, 解析個体数. (逢沢ほか未発表)

#### 4. 研究成果

##### (1) オルガネラ DNA の遺伝的変異

mtDNA について、全サンプルを解析したところ、4つのハプロタイプが見られた。すなわち、大陸の集団にみられるハプロタイプ M1, 西岳 (NIS) を除く本州・四国の集団にみられる M2, 御嶽山 (ONT) 集団の一部にみられる M3, および西岳集団の M4 である。今回の網羅的解析によって、西岳集団内に M2 と M4 が共存することがわかった (図-1a, b)。

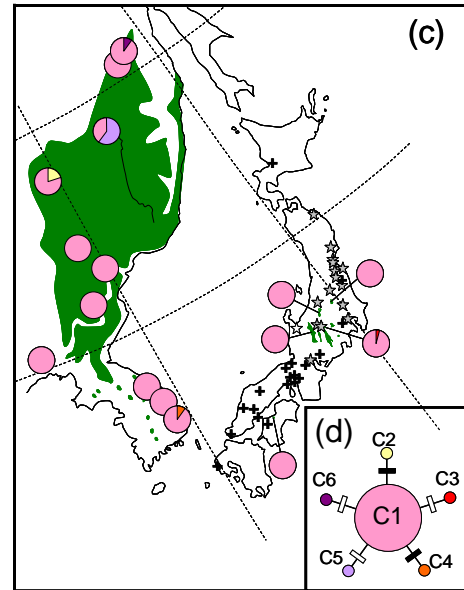
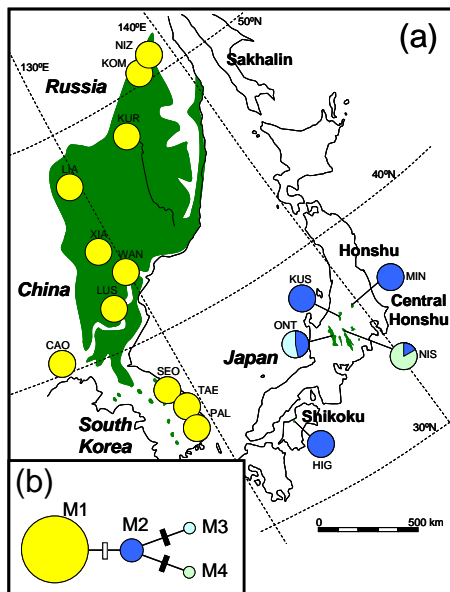


図-1 チョウセンゴヨウの分布域 (緑部分), ミトコンドリア DNA (a, b) および葉緑体 DNA (c, d) の各ハプロタイプの地理的分布, およびハプロタイプ間の系統的關係。ハプロタイプネットワーク (b, d) の枝上の白抜きボックスは塩基置換を, 黒ボックスは挿入・欠失の存在を表す。チョウセンゴヨウの大型化石遺体の産出地を星印 (最終氷期) と, 十字 (最終氷期以外の更新世) で示した (Miki 1956 および守田 2000 を基に作成) (逢沢ほか未発表)。

AMOVA の結果, mtDNA の遺伝的変異のおよそ 8 割は日本と大陸間に見られた ( $F_{RT}=0.792$ )。一方, cpDNA の 2つの領域について解析を行ったところ, 6つのハプロタイプが見つかったものの, その大部分は分布域全体にわたって広くみられる1つのハプロタイプ (C1) で占められていた (図-1c, d)。AMOVA の結果, 大陸と日本の間で cpDNA に全く分化はみられなかった。この理由として, cpDNA においては, 集団の縮小・拡大, 分断化といった地史的イベントに対応した遺伝的変異が生じなかったか, 生じたとしても, cpDNA はマツ科では父性遺伝することから, 花粉を介した高い遺伝子流動によって, 遺伝子の地理的構造が覆い隠されてしまったためと考えられた。特に分布域の狭い日本においてその影響は大きかったため, 遺伝的変異が小さい ( $H_T$ , total gene diversity, = 0.017) もと考えられた。したがって, チョウセンゴヨウの分布変遷を考える上では, mtDNA の変異に着目する必要があると考えられた。

##### (2) 大陸集団の分布変遷

mtDNA の大陸と日本間の遺伝子多様度を比較すると, 日本国内 ( $H_T=0.502$ ) のほうが大陸 ( $H_T=0$ ) よりも高かった。中国大陸においてチョウセンゴヨウのように広域的に分布する *Pinus tabulaeformis*, *P. massoniana*

および *P. hwangshanensis* のミトコンドリア DNA の  $H_T$  はそれぞれ、0.714, 0.474 および 0.584 (Chen et al. 2008; Zhou et al. 2010) と、大陸部のチョウセンゴヨウの  $H_T$  (= 0) よりも著しく高かった。このことは、大陸部のチョウセンゴヨウは現在広域的な分布域を持っているにもかかわらず、過去に遺伝的多様性を消失したような集団の歴史を有していることを示唆している。

大陸部における花粉分析結果、第四紀を通してチョウセンゴヨウの分布域は大陸部に存在し、アムール地域にも分布した可能性が示唆されている。また、中国東北地方には、氷期に1つの広域的な逃避地（レフュージア）が存在した可能性が、ヤチダモ集団の遺伝構造の欠如を説明する仮説として指摘されている (Hu et al. 2008)。一方、Kim et al. (2005) は本研究と同じ大陸部のチョウセンゴヨウサンプルを用いて、アロザイムおよび RAPD 分析を行い、遺伝的多様性が緯度とともに低下すること明らかにし、南方から北方への分布拡大があった可能性を指摘した。このように、大陸部では複数のレフュージアが存在したのか、チョウセンゴヨウが氷期・間氷期を通して広い分布域を保持し続けたのかは明らかでないが、一時的に単一のレフュージアが形成され、それを核として分布域が拡大した結果、大陸部で単一のハプロタイプからなる分布パターンが形成された可能性が最も高いと考えられる。今後は、変異性の高い核 SSR マーカーを用いて大陸部のレフュージアの有無や位置の特定を行う必要がある。

### (3) 日本集団の分布変遷

日本のチョウセンゴヨウ集団の由来を知るために、日本と大陸のハプロタイプのどちらが祖先型に近いかを調べる必要がある。そこで、mtDNA について、チョウセンゴヨウと同じゴヨウマツ類であるハイマツ (*Pinus pumila*) とキタゴヨウ (*P. parviflora* var. *pentaphylla*) についても解析を行ったところ、大陸のハプロタイプ M1 が祖先型に近いと推定された。日本ではチョウセンゴヨウの大型化石遺体は更新世を通して西日本から東北地方にかけて広く多産する (図-1c)。したがって、日本のチョウセンゴヨウは更新世前期までに大陸から移住してきて、大陸から分化した後も、日本ではレフュージア的に大きな集団が維持されていた可能性が高い。そして、日本国内において各山岳地帯への隔離などにより遺伝的分化が生じ、結果として、日本のチョウセンゴヨウの遺伝的多様性が高まった可能性が考えられる。

### (4) 核 DNA の SSR マーカースクリーニング

核 DNA の 48 遺伝子座の SSR マーカーについて、スクリーニングを行った。その結果、17 座のマーカーで良好な PCR 増幅を示した

ため、このうち特に増幅が良好な 10 座について蛍光プライマー化して、現在、解析を進めている。

昨今、チョウセンゴヨウの集団解析に向けて、チョウセンゴヨウの SSR マーカーの開発がなされた (Li et al. 2010; Sui et al. 2011)。しかし、これらの報告では特定地域の集団を対象としてマーカーが開発されている。北東アジアスケールでの広域的な遺伝的多様性の評価を行うためには、スクリーニングの段階でバイアスが生じないように、様々な地域の集団を入れることが重要と考えられる。この意味では、本研究で選抜された SSR マーカーは、現在解析中ではあるが、分布域全体を網羅した試料を用いて選抜したものであり、北東アジアスケールでのチョウセンゴヨウの遺伝的多様性の評価に適したものと考えられる。

以上のように、本研究によって、チョウセンゴヨウのオルガネラ DNA の広域的な遺伝的変異と、それを基にした分布変遷史を明らかにすることができた。北東アジアスケールで樹木の遺伝的変異を明らかにした研究は、エゾマツ変種群 (Aizawa et al. 2007, 2009)、カラマツ属 (Polezhaeva et al. 2010) など、まだ少ない。アジア地域の広域的な研究の推進が、温暖化に際する全球的な植生変化を予測する上で重要課題となっている (Pleines et al. 2008) 今日、本研究の学術的価値は世界的に高いといえる。また、チョウセンゴヨウは、北東アジアにおいて、良質材および種実 (マツの実) 資源としてその利用価値が極めて高く、その資源量は近年伐採の進行により著しく減少している (柿澤 2003)。そのため、育種および保全事業が必要とされている (Kim et al. 2005)。本研究によって、北東アジアのチョウセンゴヨウのもつ遺伝的多様性に対して、日本の集団の寄与は極めて高いこと、また遺伝子資源としての保全を考える上で、日本の集団の保全が極めて重要であることが明らかになった。この成果は、北東アジアにおけるチョウセンゴヨウの遺伝子資源の育成と保全のための基盤情報としての価値が高く、その役割は大きいと考えられる。

今後の課題として、オルガネラ DNA 解析では、大陸部におけるチョウセンゴヨウのレフュージアを特定することはできなかった。本研究によって選抜した核 DNA の SSR マーカーを用いた解析によって明らかにしていく必要がある。

### 引用文献

- Aizawa et al. (2007) Mol. Ecol., 16, 3393-3405.
- Aizawa et al. (2009) J. Biogeogr., 36, 996-1007.
- Bandelt et al. (1999) Mol. Biol. Evol., 16, 37-48.
- Chen et al. (2008) Mol. Ecol., 17: 4276-4288.
- Echt et al. (1996) Genome, 39: 1102-1108.

- Echt et al. (1999) *Can. J. Bot.*, 29: 365-371.  
Elsik et al. (2000) *Genome*, 43: 550-555.  
Excoffier et al. (2005) *Evol. Bioinform. Online*, 1: 47-50.  
Hallatschek and Nelson (2007) *Theor. Pop. Biol.*, 73, 158-170.  
Heuertz et al. (2004), *Evolution*, 58: 976-988.  
Hu et al. (2008) *Ann Bot.*, 102: 195-205.  
柿澤(2003) ロシア 森林大国の内実, 日本林業調査会.  
Kim et al. (2005) *Silvae Genet.*, 54, 235-246.  
Kuntal and Williams (2001) *J. Heredity*, 92: 327-332.  
Li et al. (2010) *Amer. J. Bot.*, e39-e41.  
Miki (1956) *Bot. Mag. Tokyo*, 69: 446-454.  
Morita (2000) *Jpn. J. Histor. Bot.*, 9: 3-20.  
Nei (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press.  
Pleines et al. (2009) *Plant Syst. Evol.*, 282, 281-294.  
Polezhaeva et al. (2010) *Mol. Ecol.*, 19, 1239-1252.  
Sui et al. (2011) *Advan. Mater. Res.*, 183-185: 259-266.  
Tsumura (2006) *Taxon*, 55:53-66.  
Zhou et al. (2010) *Evolution*, 64: 2342-2352.

5. 主な発表論文等  
(研究代表者には下線)

[学会発表] (計 1 件)  
逢沢峰昭, 北東アジアにおける北方系針葉樹の系統地理, 日本森林学会, 2010年4月3日, 筑波大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

逢沢 峰昭 (AIZAWA MINEAKI)  
宇都宮大学・農学部・助教  
研究者番号: 70436294

(2) 研究協力者

吉丸 博志 (YOSHIMARU HIROSHI)  
独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝  
研究領域・領域長  
研究者番号: 20353914